

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan menggunakan metode penelitian eksperimental dengan membandingkan pengaruh konsentrasi ekstrak etanol Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*) terhadap karakteristik fisik dan zona hambat antibakteri *Staphylococcus aureus* pada sediaan krim.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penggunaan konsentrasi ekstrak etanol Bawang Dayak dengan konsentrasi 2%, 4%, dan 6%.

4.2.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah karakteristik fisik dan diameter zona hambat antibakteri pada *Staphylococcus aureus*.

4.3 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini meliputi :

- a. Krim adalah bentuk sediaan semipadat yang mengandung satu atau lebih agen obat yang terlarut atau terdispersi dalam basis yang sesuai (Depkes, 2014).
- b. Krim ekstrak etanol Bawang Dayak adalah sediaan semipadat berupa krim yang menggunakan ekstrak etanol Bawang Dayak sebagai antibakteri dengan penambahan bahan tambahan lain.
- c. Kontrol positif adalah kelompok perlakuan yang besar kemungkinannya menghasilkan efek atau perubahan pada variabel tergantung. Kelompok kontrol positif bertujuan untuk membuktikan bahwa eksperimen yang digunakan sudah tepat dan dapat menghasilkan perubahan positif pada variabel tergantung. Adapun kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah antibiotik Oksitetrasiklin Salep.
- d. Uji karakteristik fisik meliputi organoleptis, tipe emulsi, homogenitas, pH, viskositas, dan daya sebar.
- e. Zona hambat, yaitu daerah jernih disekitar lubang sumuran yang tidak ditumbuhi oleh bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang dan Laboratorium Biomedik Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2019 – Juli 2019.

4.5 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan untuk sediaan krim yaitu :

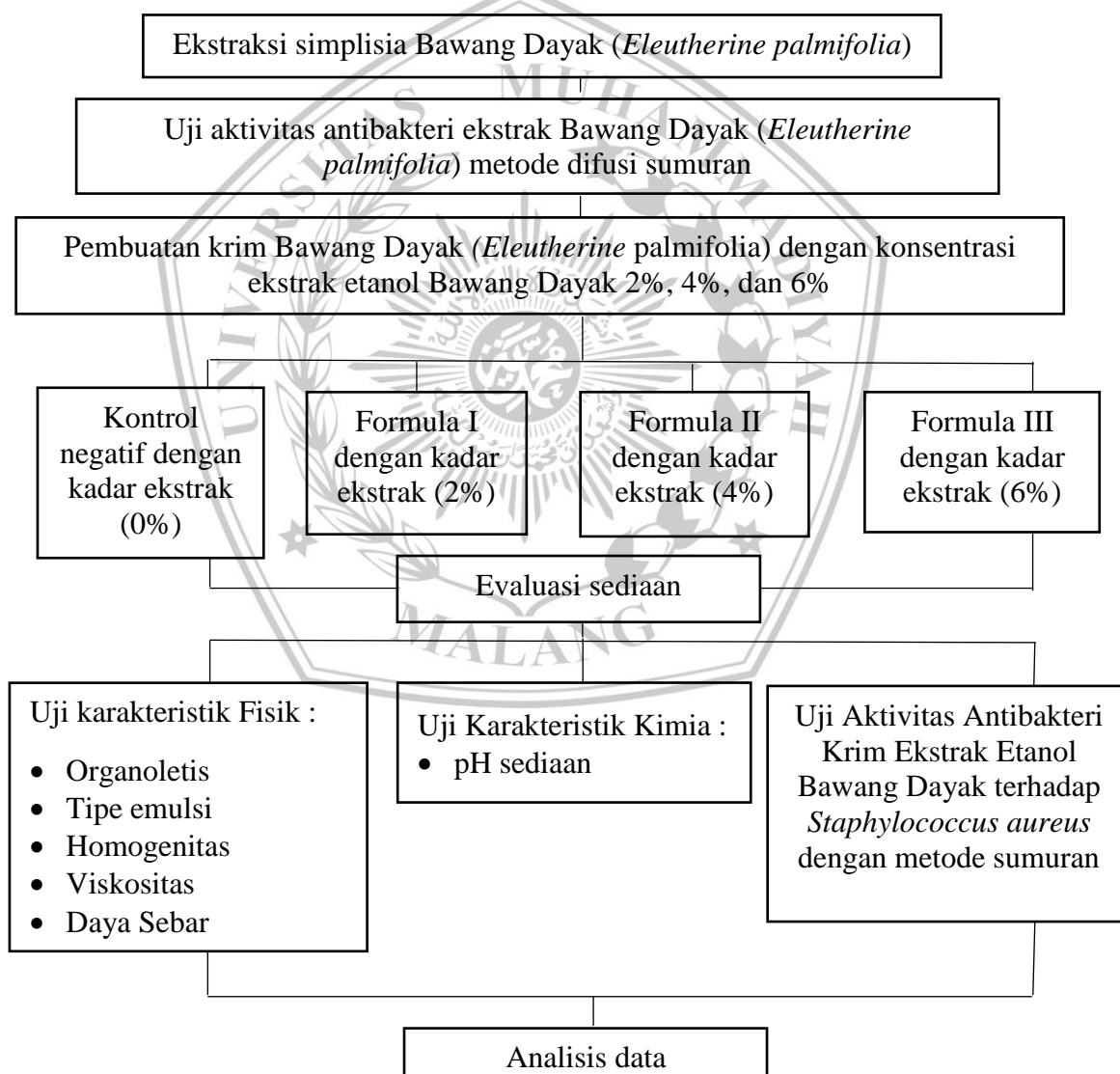
1. Bawang Dayak yang diperoleh dari petani di Kabupaten Tabalong, Kalimantan Selatan sebagai bahan aktif
2. Etanol 96%
3. *Heavy Liquid Paraffin* (Tudapetrol KG)
4. *White Vaseline* (Tudapetrol KG)
5. *Stearic Acid* (PT Wilmar Nabati Indonesia)
6. *Propylen glycol* (Dow Chemical Pasific)
7. Trietanolamin (PT Panadia Corporation Indonesia)
8. Metil Paraben (UENO Fine Chemicals, Japan)
9. Propil Paraben (UENO Fine Chemicals, Japan)
10. Butil Hidroksi Toluene (Sterlitamak Petrochemical Plant)
11. Aquades (PT Panadia Corporation Indonesia)
12. Bakteri *Staphylococcus aureus* (Laboratorium Biomedik Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang)
13. Kontrol positif antibiotik Oksitetrasiklin Salep

4.6 Alat

Alat yang digunakan di dalam penelitian adalah mortir dan stamper, alat-alat gelas, cawan petri, pH meter, Viskometer *Brookfield*, neraca analitik gram, peralatan uji daya sebar, waterbath, hotplate, jarum ose steril, mikropipet, bunsen, inkubator, dan autoklaf.

4.7 Metode Kerja

Pada penelitian ini diawali dengan proses ekstraksi simplisia Bawang Dayak dengan etanol 96% yang dilakukan di Materia Medika, Batu, Malang. Selanjutnya dilakukan pembuatan sediaan krim ekstrak etanol Bawang Dayak dengan konsentrasi bahan aktif (FI) 2%, (FII) 4%, (FIII) 6% dan sebagai kontrol negatif dibuat krim tanpa ekstrak etanol Dawang Dayak. Kemudian dari 4 formula akan di uji karakteristik fisik sediaan yang meliputi uji organoleptis, uji tipe emulsi, homogenitas, pH sediaan, viskositas, dan daya sebar. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Semua formula dilakukan replikasi 3 kali dengan bobot masing-masing sediaan sebanyak 200 gram.



Gambar 4.1 Skema kerja penelitian

4.8 Rancangan Formula

Dalam penelitian ini terdapat 3 formula krim ekstrak etanol Bawang Dayak dengan berbagai konsentrasi bahan aktif dan 1 formula digunakan sebagai kontrol negatif.

4.8.1 Formulasi Basis *Vanishing Cream*

Basis krim yang dibuat dari *vanishing cream* (Syamsul dkk, 2015) yang telah dimodifikasi oleh peneliti

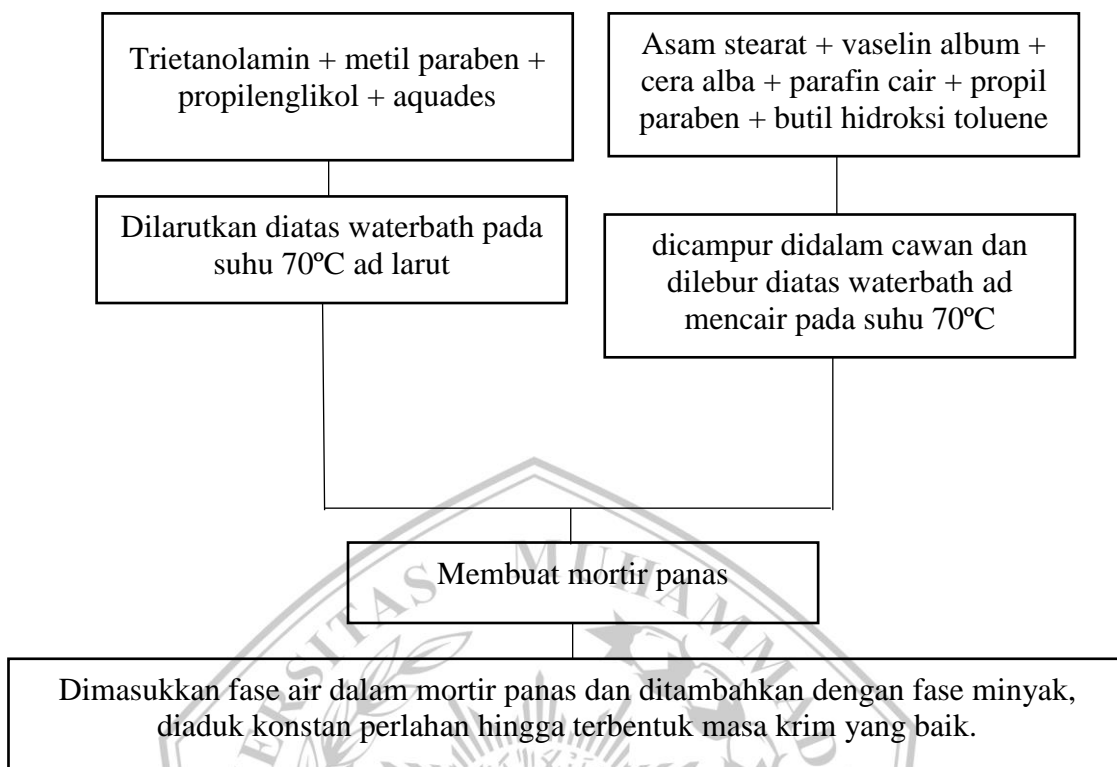
Tabel IV.1 Formula basis *vanishing cream*

No	Bahan	Fungsi	Persentase (%)
1	Asam stearate	Emulgator	12,5
2	Trietanolamin	Emulgator	1,5
3	Vaselin album	Basis Krim	10
4	Cera alba	Basis Krim	0,5
5	Parafin cair	Emolien	10
6	Propilenglikol	Humektan	10
7	Metil Paraben	Pengawet	0,05
8	Propil Paraben	Pengawet	0,1
9	Butil Hidroksi Toluene	Antioksidan	0,1
10	Aquades	Pelarut	Ad 100

4.8.2 Cara Pembuatan Basis *Vanishing Cream*

Proses pembuatan basis *vanishing cream* dimulai dari mencampurkan seluruh fase minyak, yaitu : asam stearat, vaselin album, cera alba, parafin cair, propil paraben, dan butil hidroksi toluene dengan cara dilebur di atas waterbath menjadi satu dengan suhu 70⁰C sampai cair. Selanjutnya mencampurkan seluruh fase air, yaitu: trietanolamin, metil paraben, propilenglikol dan aquades kemudian dipanaskan diatas waterbath pada suhu 70⁰C ditunggu hingga larut. Kemudian membuat mortir panas dengan menuangkan air panas ke dalam mortir untuk menyamakan suhu antara fase minyak dan fase air. Fase air dituangkan ke dalam mortir dan dilanjutkan dengan menuangkan fase minyak ke dalam fase air. Diaduk perlahan dan konstan hingga terbentuk massa krim yang baik.

Skema cara pembuatan basis *vanishing cream* dapat dilihat pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Skema Cara Pembuatan Basis *Vanishing Cream*

4.8.3 Formula Sediaan Krim

Berikut ini adalah formula sediaan krim antibakteri ekstrak etanol Bawang Dayak dengan basis *vanishing cream* :

Tabel IV.2 Formula Sediaan Krim Antibakteri Ekstrak Etanol Bawang Dayak

Komposisi		Formula Krim			
Bahan	Fungsi	K (-)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
Ekstrak etanol Bawang Dayak	Zat aktif	-	2%	4%	6%
<i>Vanishing Cream</i>	Basis Krim	100%	98%	96%	94%

Keterangan : F1 : mengandung konsentrasi bahan aktif 2%

F2 : mengandung konsentrasi bahan aktif 4%

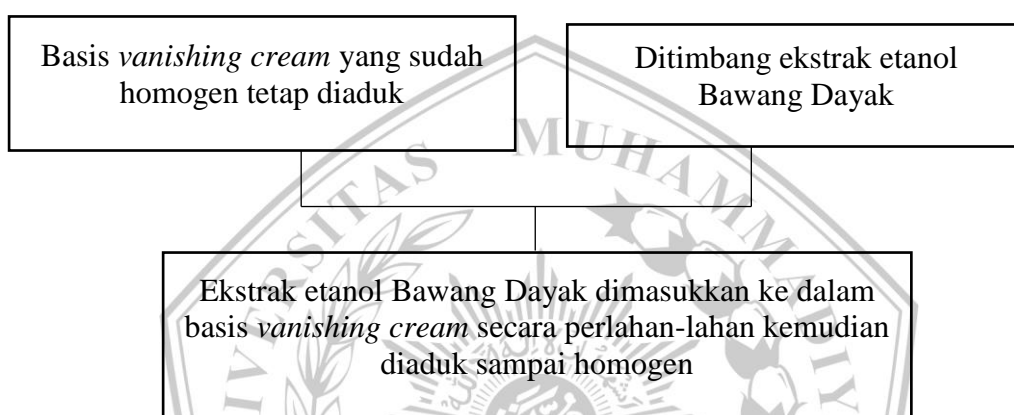
F3 : mengandung konsentrasi bahan aktif 6%

K (-) : basis krim tanpa ekstrak etanol Bawang Dayak

4.8.4 Cara Pembuatan Sediaan Krim

Proses pembuatan sediaan krim antibakteri tipe m/a ekstrak etanol Bawang Dayak dilakukan dengan menambahkan ekstrak etanol Bawang Dayak ke dalam basis *vanishing cream* dalam mortir kemudian diaduk sampai homogen. Sediaan krim dimasukkan ke dalam wadah dan disimpan.

Skema cara pembuatan krim ekstrak etanol Bawang Dayak dapat dilihat pada gambar 4.3.



Gambar 4.3 Skema Pembuatan Krim Ekstrak Etanol Bawang Dayak

4.9 Evaluasi Sediaan

4.9.1 Evaluasi Karakteristik Fisik Sediaan

1. Organoleptis

Pengamatan organoleptis sediaan dimaksudkan untuk melihat tampilan fisik sediaan yang meliputi bentuk, warna dan bau (Erawati dkk, 2015).

2. Tipe emulsi

Evaluasi tipe krim dilakukan dengan cara memberikan 1 tetes larutan methylene blue pada 0,1 gram sediaan krim, kemudian diamati penyebaran warna *methylene blue* dalam sediaan dibawah mikroskop. Jika warna menyebar secara merata pada sediaan krim, maka tipe krim adalah minyak dalam air (m/a), tetapi jika warna hanya berupa bintik-bintik maka tipe krim adalah air dalam minyak (a/m) (Agustin, 2013).

3. Homogenitas

Sediaan ditimbang 0,1 gram kemudian dioleskan secara merata dan tipis pada kaca arloji. Krim harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya bintik-bintik (Agustin, 2013).

4. pH sediaan

Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan alat pH meter. Alat dikalibrasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Kalibrasi dilakukan dengan larutan dapar pH 4,0 dan pH 7,0 hingga alat menunjukkan harga pH tersebut. Kemudian elektrode dicuci dengan air dan dikeringkan dengan tisu (Erawati dkk, 2015). Pemeriksaan dilakukan dengan mencelupkan elektrode pH meter ke dalam krim, selanjutnya angka pada pH meter dibiarkan bergerak sampai menunjukkan angka tetap kemudian dicatat (Akhtar dkk, 2011). pH standar krim menurut SNI 16-4399-1996 yaitu 4,5-8,0 (SNI, 1996). Krim yang baik juga harus memiliki pH sesuai dengan pH kulit yaitu 4,0-6,5 (Ali and Yosipovitch, 2013).

5. Viskositas

Pengukuran viskositas sediaan krim dilakukan dengan menggunakan alat Viskometer *Brookfield*. Pertama 150 gram krim dimasukkan ke dalam beaker glass (Zulfa dkk, 2018). Kemudian dipasang spindel nomer 4, lalu spindel diturunkan sampai batas spindel tercelup pada sediaan krim, kemudian dinyalakan alat dengan menekan tombol on. Kecepatan alat diatur mulai 0,3 rpm. Dari masing-masing pengukuran dengan perbedaan kecepatan rpm dibaca skala hingga jarum merah yang bergerak telah stabil (Rabima dan Marshall, 2017). Syarat viskositas untuk sediaan krim adalah 2000 – 50000 cps (SNI, 1996).

6. Daya Sebar

Uji daya sebar dilakukan untuk mengetahui kelunakan sediaan krim saat digunakan pada kulit. Sebanyak 0,5 gram sediaan krim diletakkan di tengah-tengah kaca bulat. Kemudian ditutup kaca lain yang telah ditimbang terlebih dahulu dan dibiarkan selama 1 menit. Krim yang menyebar diukur diameternya dengan mengambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi. Diatasnya ditambah beban 50 gram, dibiarkan 1 menit dan diukur diameter sebaranya. Diteruskan penambahan beban tiap kali sebesar 50 gram, setelah 1 menit diukur hingga diperoleh diameter yang cukup untuk melihat pengaruh beban terhadap perubahan diameter sebar krim

(Voigt, 1984). Daya sebar sediaan semisolid yang baik adalah 50-70 mm (Voigt, 1994).

4.10 Uji Aktivitas Antibakteri

4.10.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan cara mencuci alat-alat yang dibutuhkan dengan menggunakan sabun cuci selama 5 menit. Alat-alat dikeringkan dengan posisi terbalik diudara terbuka. Setelah kering dibungkus dengan kertas perkamen. Alat-alat dari kaca disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara pembakaran di atas api langsung (Lay dan Hastowo, 1992).

4.10.2 Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* diambil 1 ose steril, kemudian dilarutkan dengan 10 mL larutan NaCl 0,9% dalam tabung reaksi secara aseptik dan dikocok sampai homogen (Misna dan Diana, 2016). Tingkat kekeruhan suspensi bakteri dibandingkan dengan standard 0,5 McFarland (jumlah bakteri $1-2 \times 10^8$ CFU/ml) (Cockerill *et al*, 2012).

4.10.3 Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)

- Media MHA steril sebanyak 19 gram dilarutkan dalam 500 mL air suling
- Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit
- Didinginkan hingga suhu 45°C - 50°C (Cockerill *et al*, 2012)
- Kemudian media MHA dituangkan ke dalam cawan petri steril masing-masing 20 ml dan dibiarkan beberapa saat hingga memadat (Lay, 1994).

4.10.4 Peremajaan Biakan Bakteri

Bakteri uji diremajakan di atas media Mueller Hinton yang telah padat dengan cara diambil 1 ose bakteri dan digoreskan pada media. Bakteri kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rusli dkk, 2016).

4.10.5 Uji Daya Hambat Bakteri

- Dibuat lubang pada media Mueller Hinton dengan diameter sumuran 6 mm sebanyak 5 lubang (Ikhsanudin dan Ningsih, 2017)
- Sediaan krim, kontrol negatif, dan kontrol positif dimasukkan 100 µL pada lubang tersebut (Balouiri *et al*, 2016)

- Kemudian cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diamati dan diukur zona hambat yang diperoleh dengan mengukur diameter daerah bening pada masing-masing sampel di sekitar sumuran (Difco, 1977).

4.11 Analisis Data

Hasil pengujian karakteristik fisik berupa data pH, viskositas, daya sebar dan pengujian aktivitas antibakteri yang berupa data diameter zona hambat dianalisis menggunakan metode *One-way Anova*. Dari data yang diperoleh dilakukan analisis statistik dengan derajat kepercayaan $\alpha = 0,05$. Untuk mengetahui formula mana yang terdapat perbedaan bermakna dapat dilihat dari harga P hitung. Apabila hasil yang didapat P hitung $<$ derajat kemaknaan 0,05 menunjukkan ada perbedaan yang bermakna, sehingga dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*) pada karakteristik fisik dan uji *Honestly Significant Difference* (HSD) pada aktivitas antibakteri untuk mengetahui data mana yang berbeda.

Hipotesis :

1. Karakteristik Fisik :

Ho = Tidak ada perbedaan karakteristik fisik pada sediaan krim ekstrak etanol Bawang Dayak dengan variasi konsentrasi 2%, 4%, dan 6%

Ha = Terdapat perbedaan karakteristik fisik pada sediaan krim ekstrak etanol Bawang Dayak dengan variasi konsentrasi 2%, 4%, dan 6%

2. Diameter Zona Hambat :

Ho = Tidak ada perbedaan diameter zona hambat pada sediaan krim ekstrak etanol Bawang Dayak dengan variasi konsentrasi 2%, 4%, dan 6%

Ha = Terdapat perbedaan diameter zona hambat pada sediaan krim ekstrak etanol Bawang Dayak dengan variasi konsentrasi 2%, 4%, dan 6%